

10/070387

Rec'd PCT/PTO 06 MAR 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Naoki MIDOH et al.

Attn: BOX PCT

Serial No. NEW

Docket No. 2002_0317A

Filed March 6, 2002

CYCLIC DEPSIPEPTIDE SYNTHETASE AND
GENE THEREOF, AND MASS PRODUCTION
SYSTEM FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDE

[Corresponding to PCT/JP00/06103

Filed September 7, 2000]

SUBMISSION OF DEPOSIT RECEIPTS

Assistant Commissioner for Patents,
Washington, DC 20231

Sir:

There are submitted herewith copies of the receipts of the deposits of the three microorganisms referred to in the specification.

The deposits have been made under the International Budapest Treaty as accession number(s) FERM BP-2671, FERM BP-7253 and FERM BP-7254.

Respectfully submitted,
Naoki MIDOH et al.

By Warren Cheek
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicants

WMC/dlk
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
March 6, 2002

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 明治製薬株式会社
取締役社長 笹井 章
寄託者 殿
あて名 〒104
東京都中央区京橋二丁目4番16号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

無胞子不完全菌 PF1022

(受託番号)

微工研条寄第 2671 号
(FERM BP- 2671)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

 科学的性質 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 1月24日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

平成 元年 1月24日に寄託された微工研菌寄第 P- 10504 号より移管)

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Fermentation Research Institute
Agency of Industrial Science and Technology所長事務代理 研究企画官 中村吉宏
Yoshihiro Nakamura DIRECTOR GENERAL AD INTERIM.

DIRECTOR, RESEARCH PLANT DIVISION

あて名: 日本国茨城県つくば市東大路1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名（名称） 明治製菓株式会社
取締役社長 北里 一郎
寄託者 殿
あて名 〒 東京都中央区京橋二丁目4番16号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli /pPFsyn	(受託番号) FERM BP- 7253
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成11年9月1日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成11年9月1日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。 そして、平成12年7月31日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成11年9月1日に寄託された微工研菌寄第P-17541号より移管)	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大曾 信一 Dr. Shigeo Onishi Director-General</p> <p>あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p>平成12年(2000) 7月31日</p>	

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 明治製菓株式会社
 取締役社長 北里 一郎
 寄託者 殿
 あて名 〒 東京都中央区京橋二丁目4番16号

1. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）
 Escherichia coli / pPFsynN

（受託番号）
 FERM BP- 7254

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成11年9月1日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成11年9月1日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
 そして、平成12年7月31日に原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
 （平成11年9月1日に寄託された微工研菌寄第P-17542号より移管）

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
 Agency of Natural Resources and Energy
 生命科学技術研究所
 工業技術院

所長 大曾 信一
 Dr. Shigeo Ono Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）
 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
 305-8566, JAPAN

平成12年（2000）7月31日

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year) 23 May 2001 (23.05.01)	Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/JP00/06103	Applicant's or agent's file reference 127184-649
International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00)	Priority date (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99)
Applicant	
MIDOH, Naoki et al.	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

30 March 2001 (30.03.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Maria Kirchner</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	---



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
+31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Hall, Marina
Elkington and Fife
Prospect House,
8 Pembroke Road
Sevenoaks,
Kent TN13 1XR
GRANDE BRETAGNE

RECEIVED

16 MAY 2003

E. & F. SEVENOAKS

Datum/Date

16.05.03

Zeichen/Ref./Réf. MH/G18605EP	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°./Patent Nr./Patent No./Brevet n°. 00957009.4-2403-JP0006103
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire Meiji Seika Kaisha, Ltd.	

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
X	BURMESTER J ET AL: "HIGHLY CONSERVED N-METHYLTRANSFERASES AS AN INTEGRAL PART OF PEPTIDE SYNTHASES" BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 37, no. 2, October 1995 (1995-10), pages 201-207, XP000965322 ISSN: 1039-9712 see whole document and in particular "Summary" and Figs 1 and 2. ----	1-14	C12N9/00 C12N15/52 C12N1/15 C12P21/04 C12P21/00
X, D	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, vol. 97, no. 7, November 1997 (1997-11), pages 2651-2673, XP002133489 ISSN: 0009-2665 see "B. N-Methyltransferase Domain" * page 2654, right-hand column, line 8 - page 2656, right-hand column, paragraph 2; figure 3 * ----	1,2,4, 7-14	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			C12P C12N
2	Place of search MUNICH	Date of completion of the search 9 May 2003	Examiner Ury, A
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			

E P

U S

P C T

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 127184-649	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/06103	国際出願日 (日.月.年)	07.09.00	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 明治薬業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。3. 発明の单一性が欠如している(第II欄参照)。4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

 出願人が提出したものと承認する。 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし 出願人は図を示さなかった。 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第III欄 要約（第1ページの5の続き）

要 約 書

本発明によれば環状デプシペプチド、特にP F 1 0 2 2 物質、を合成する酵素およびその遺伝子が提供される。本発明による環状デプシペプチド合成酵素は、(a)配列番号2のアミノ酸配列または(b)置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号2のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列を含んでなるものである。本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子は、上記環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。本発明によればまた、環状デプシペプチドの大量生産系、環状デプシペプチド合成酵素の製造法等が提供される。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 9/00, 15/52, 1/15, C12P 21/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N 9/00-9/94, 15/52-15/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WECKWERTH, Wolfram et al., "Biosynthesis of PF1022A and Related Cyclooctadepsipeptides", The Journal of Biological Chemistry, June 9, 2000, Volume 275, Number 23, pages 17909-17915	1
A	EP, 780468, A1 (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.) 25.6月.1997 (25.06.97) & WO, 97/00944, A1 & US, 5763221, A	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田俊生

4N 8214



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	HAESE, Angela et al., "Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing <i>N</i> -methyldepsipeptide formation in <i>Fusarium scirpi</i> ", Molecular Microbiology, March, 1993, Volume 7, Number 6, pages 905-914	1-14
A	SASAKI, Toru et al., "A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A", The Journal of Antibiotics, May 25, 1992, Volume 45, Number 5, pages 692-697	1-14
A	EP, 382173, A2 (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.) 16.8月.1990 (16.08.90) & AU, 9049215, A & NO, 9000528, A & CA, 2009508, A & JP, 3-35796, A & CN, 1046940, A & US, 5116815, A & DE, 69023934, E & ES, 2083392, T3 & KR, 132051, B1	1-14

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月15日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/18179 A1

(51) 国際特許分類7: C12N 9/00, 15/52, 1/15, C12P 21/04

ラーセ 29, マックス・フォルマー・インスティテュット・フェア・ビオフィジカル・ケミー・ウント・ビオケミー, テヒニッケ・ウニバージитет・ベルリン Berlin (DE).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06103

(74) 代理人: 佐藤一雄, 外 (SATO, Kazuo et al.) ; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル 323号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000年9月7日 (07.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) 優先権データ:
特願平11/253040 1999年9月7日 (07.09.1999) JP
特願2000/104291 2000年4月6日 (06.04.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。



A1

(54) Title: CYCLIC DEPSIPEPTIDE SYNTHASES, GENES THEREOF AND MASS PRODUCTION SYSTEM OF CYCLIC DEPSIPEPTIDE

WO 01/18179

(54) 発明の名称: 環状デプシペプチド合成酵素およびその遺伝子並びに環状デプシペプチドの大量生産系

(57) Abstract: Enzymes synthesizing cyclic depsipeptides (in particular a substance PF1022) and genes thereof. These cyclic depsipeptide synthases contain: (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2; or (b) an amino acid sequence derived from the above-described amino acid sequence by one or more modifications selected from among substitution, deletion, addition and insertion and having a cyclic depsipeptide synthase activity. The cyclic depsipeptide synthase genes comprise nucleotide sequences encoding the above-described cyclic depsipeptide synthases. Moreover, a mass production system of a cyclic depsipeptide, a process for producing a cyclic depsipeptide synthase, etc. are provided.

[統葉有]



(57) 要約:

本発明によれば環状デプシペプチド、特にP F 1 0 2 2物質、を合成する酵素およびその遺伝子が提供される。本発明による環状デプシペプチド合成酵素は、(a)配列番号2のアミノ酸配列または(b)置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号2のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列を含んでなるものである。本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子は、上記環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。本発明によればまた、環状デプシペプチドの大量生産系、環状デプシペプチド合成酵素の製造法等が提供される。

明細書

環状デプシペプチド合成酵素およびその遺伝子
並びに環状デプシペプチドの大量生産系

発明の背景

発明の分野

本発明は、環状デプシペプチド合成酵素およびその遺伝子並びに環状デプシペプチドの大量生産系に関し、更に詳細には、駆虫活性を有する P F 1 0 2 2 物質の合成酵素およびその遺伝子並びに P F 1 0 2 2 物質の大量生産系に関する。

関連技術の説明

P F 1 0 2 2 物質 [シクロ (D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル-D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル)] は、アゴノマイセタレス (Agonomycetales) に属する糸状菌、P F 1 0 2 2 菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) により生産される環状デプシペプチドであり、動物寄生性の線虫類に対して極めて高い駆虫活性を示す (特開平3-35796号、Sasaki, T. et al. J. Antibiotics., 45, 692, (1992))。そのため、本物質は動物用の駆虫薬として有用であると共に、さらに高活性な本物質の誘導体を合成するための原料として有用である。

一般に、天然から分離された微生物の生産する二次代謝産物の量は、微量である。そのため、これを産業的に利用するためには、二次代謝産物の生産量を向上させる必要がある。生産量を向上させるためには、培養方法の検討、培地成分の検討、および前駆体の添加といった発酵条件の改良、並びに紫外線照射または突然変異誘発剤による突然変異を利用した菌株の改良が行われる。最近では、これらの方に加えて遺伝子組換えの手法を利用した生産性の向上も行われるようになってきた。

その方法としては、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強、生合成の制御遺伝子の発現増強、不必要的生合成経路の遮断、等が行われている (Khetan, A. and Hu, W.-S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd edition)

n, p. 717, (1999))。また、特殊な例としては、酸素利用能の向上を目的として、細菌のヘモグロビン遺伝子を発現させ、生産性を向上させる方法も知られており (Minas, W. et al. Biotechnol. Prog., 14, 561, (1998))。

遺伝子組換えの手法を用いて生産性の向上を図る際に、最も一般的な手法は、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強である。この手法を適応するためには、対象とする微生物において形質転換の方法が確立していること、発現増強のために利用可能なプロモーターおよびターミネーターが存在すること、また生合成経路が明らかとなっており、それらの遺伝子が単離されていることが必要である。P F 1022 物質生産菌においては、形質転換により外来遺伝子を導入することに成功している (WO97/00944号) が、生合成経路の遺伝子は単離されていない。

P F 1022 物質は、L-N-メチルロイシン、D-乳酸、およびD-フェニル乳酸がエステル結合およびアミド結合を介して結合した構造からなり、生産菌中では4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、2分子のD-フェニル乳酸から、ある種のペプチド合成酵素により合成されると考えられる。ペプチド合成酵素とは、アミノ酸やドラクトン等の微生物の二次代謝産物の生合成を行う酵素であり、既に幾つかのペプチド合成酵素の配列が明らかとなっている (Marahiel, M.A. et al. Chem. Rev., 97, 2651, (1997))。この酵素による反応は、mRNAを錆型としたリボソームによるタンパク質の合成系とは全く異なっている。ペプチド合成酵素は、各基質に対して1つのドメインを持ち、各基質はこのドメインでATPにより活性化され、ドメイン中のホスホパンテン酸を介して結合し、これらが各ドメイン間の領域の触媒作用によりアミド結合やエステル結合を形成すると考えられている。

発明の概要

本発明は環状デプシペプチド、特にP F 1022 物質、を合成する酵素（以下「環状デプシペプチド合成酵素」とする）を提供することをその目的とする。

本発明はまた、環状デプシペプチド合成酵素をコードする遺伝子（以下「環状デプシペプチド合成酵素遺伝子」とする）を提供することをその目的とする。

本発明は更にまた、環状デプシペプチド合成酵素を発現させるための組換えベクターおよび形質転換体、並びに環状デプシペプチドの大量生産系およびその製

造法の提供をその目的とする。

本発明は、環状デプシペプチド合成酵素の製造法の提供をその目的とする。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素は、下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質である：

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、および
(b) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子は、環状デプシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列からなるものである。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子はまた、下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる：

(c) 配列番号 1 の DNA 配列、
(d) 配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 70 % の同一性を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、
(e) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする配列番号 1 の DNA 配列の改変 DNA 配列、および
(f) ストリンジエントな条件下で配列番号 1 の DNA 配列とハイブリダイズし、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列。

本発明による組換えベクターは、本発明による環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を含んでなるものである。

本発明による形質転換体および環状デプシペプチドの大量生産系は、本発明による組換えベクターを含んでなる宿主である。

本発明による環状デプシペプチドの製造法は、本発明による形質転換体を培養し、培養物から環状デプシペプチドを採取することを含んでなるものである。

本発明による環状デプシペプチド合成酵素の製造法は、本発明による形質転換体を培養し、培養物から環状デプシペプチド合成酵素を採取することを含んでな

るものである。

本発明によれば、環状デプシペプチド合成酵素をP F 1 0 2 2 物質生産菌において過剰発現させることができ、またP F 1 0 2 2 物質を大量に生産させることができる。

図面の簡単な説明

図1はプラスミドpABP/PFsynの作製方法を示す。

図2は_{Abp1}遺伝子を含む6kbのHindIII断片の制限酵素地図を示す。

図3はpABPdの構成および制限酵素地図を示す。

図4は親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を示す。

図5は親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を示す。

発明の具体的説明

微生物の寄託

実施例1 1. に記載されるP F 1 0 2 2 菌株は、1989年1月24日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-2671である。

実施例2 1. (1) に記載されるプラスミドpPFsynで形質転換された大腸菌(DH5 α)は、1999年9月1日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7253である。

実施例2 1. (1) に記載されるプラスミドpPFsynNで形質転換された大腸菌(DH5 α)は、1999年9月1日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7254である。

遺伝子およびタンパク質

本発明によれば環状デプシペプチド合成酵素、好ましくはP F 1 0 2 2 物質合成酵素、およびその遺伝子が提供される。

本発明による酵素は、4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、および2分

子のD-フェニル乳酸に作用して、PF1022物質を合成できる。D-乳酸、L-ロイシン、およびD-フェニル乳酸をあらかじめ修飾しておくことによりPF1022物質の誘導体を製造できる。

PF1022物質の誘導体としては、例えば、PF1022物質中の二つのフェニル基のパラ位がアミノ基により置換されたものが挙げられる。この場合、PF1022物質の誘導体の合成基質としては、例えば、D-フェニル乳酸の代わりにD-p-アミノフェニル乳酸を使用できる。

配列(b)において、改変の数は、例えば1～数個、より具体的には1～6個であることができる。

配列(e)において、改変の数は、例えば1～数十個であることができる。

配列(b)および配列(e)において変異が複数個存在する場合、導入された変異の種類は同一でも異なっていてもよい。

配列(d)において、配列番号1のDNA配列との同一性は、好ましくは少くとも80%、より好ましくは少くとも90%、最も好ましくは少くとも95%であることができる。

配列(f)において、「ストリンジエントな条件」とは、ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄操作を、高温下低塩濃度溶液中で行うことを意味し、例えば、0.2×SSC濃度(1×SSC: 15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム)、0.1% SDS溶液中で60°C、15分間の洗浄条件を意味する。

配列(b)に関して、「環状デプシペプチド合成酵素活性を有する」か否かは、例えば、環状デプシペプチドの基質を準備し、被験タンパク質を作用させ、環状デプシペプチドの生成を例えばクロマトグラフィーによって確認することにより評価することができる。

配列(d)、(e)、および(f)に関して、「環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする」か否かは、例えば、実施例2に記載のように被験ヌクレオチド配列を宿主にて発現させ、得られたタンパク質を環状デプシペプチドの基質と作用させ、環状デプシペプチドの生成を例えばクロマトグラフィーによって確認することにより評価することができる。

本発明による合成酵素のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするヌク

レオチド配列は容易に定まり、配列番号2に記載されるアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を選択することができる。従って、本発明による合成酵素をコードするヌクレオチド配列とは、配列番号1に記載のDNA配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードするDNA配列であって縮重関係にあるコドンをDNA配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応するRNA配列も含まれる。

本発明による遺伝子は例えば下記のようにして得ることができる。

P F 1 0 2 2 物質生産菌からゲノムDNAを抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクターを用いて、P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノムDNAからなるライブラリーを作製する。ペプチド合成酵素のアミノ酸配列の保存領域、あるいはP F 1 0 2 2 物質生産菌から精製した環状ペプチド合成酵素の部分アミノ酸配列を元に、適当なプライマーを合成し、それを用いてP F 1 0 2 2 物質生産菌由来のゲノムDNAを鋳型としたPCR法を実施し、環状ペプチド合成酵素遺伝子のDNA断片を増幅する。このDNA断片をプローブとして用い、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行う。このようにして、環状ペプチド合成酵素遺伝子の全域を単離することができる。このDNA断片の塩基配列を決定した後、翻訳開始コドンの上流および翻訳終始コドンの下流に、PCR等の手法により適当な制限酵素切断部位を導入し、環状ペプチド合成酵素遺伝子のみを含む遺伝子断片を得ることができる。

組換えベクター

本発明によれば環状デブシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列を含んでなる組換えベクターが提供される。

本発明による組換えベクターの構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明において使用できるベクターとしては、宿主染色体DNAに組込まれるものや、自己複製可能な自律的複製配列を有するベクターを宿主細胞内でプラスミド状態で存在させるものが挙げられ、例えば、pUC系(pUC18またはpUC118等)、pBluescript系(pBluescriptII KS+等)、およびpBR322等のプラスミドが挙げられる。宿主細胞内に存在する遺伝子のコピー数は、1コピーでも複数であっても良い。

本発明による組換えベクターは、例えば、環状デブシペプチド合成酵素をコードするヌクレオチド配列の上流にプロモーターを、また下流にターミネーターをそれぞれ作動可能に連結し、場合によっては遺伝子マーカーおよび／または他の制御配列を作動可能に連結することにより作製できる。

本発明による遺伝子へのプロモーターおよびターミネーターの連結、および発現ユニットのベクターへの挿入は、公知の方法に従って行うことができる。

本発明に用いるプロモーターおよびターミネーターは特に限定されず、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、エノラーゼ等の解糖系酵素遺伝子の制御配列、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ等のアミノ酸合成系酵素遺伝子の制御配列、アミラーゼ、プロテアーゼ、リバーゼ、セルラーゼ、アセトアミダーゼ等の加水分解酵素遺伝子の制御配列、ナイトレートレダクターゼ、オロチジン-5'-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等の酸化還元酵素遺伝子の制御配列、およびAbp1等のP F 1 0 2 2物質生産菌中で高発現するP F 1 0 2 2物質生産菌由来の遺伝子の制御配列が挙げられる。

本発明による遺伝子を他のタンパク質の翻訳領域をコードする外来遺伝子と連結させて融合タンパク質として発現させてもよい。

遺伝子マーカーの導入は、例えば、制御配列にP C R法により適当な制限酵素切断部位を導入し、これをプラスミドベクターに挿入した後、薬剤耐性遺伝子および／または栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカー遺伝子を連結する事により行うことができる。

遺伝子マーカーは形質転換体の選択手法に応じて適宜選択できるが、例えば、薬剤耐性をコードする遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。薬剤耐性遺伝子としては、デストマイシン、ベノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、G418、ブレオマイシン、ビアラホス、プラスチサイシンS、フレオマイシン、フォスフィノスリシン、アンビシリソ、カナマイシン等の薬剤に対する遺伝子が挙げられる。栄養要求性を相補する遺伝子としては、amdS、pyrG、argB、trpC、niaD、TRP1、LEU2、URA3等の遺伝子が挙げられる。

形質転換体および環状デプシペプチドの製造

本発明によれば前記ベクターにより形質転換された宿主が提供される。

本発明において使用できる宿主としては、遺伝子組換えの宿主として使用可能な微生物であれば特に限定されるものではない。使用できる宿主の例としては、任意の細菌類または真菌類の微生物が挙げられ、好ましくは大腸菌、バチルス属細菌、放線菌、酵母、糸状菌、より好ましくは、PF1022物質を生産する糸状菌、最も好ましくはPF1022菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) である。

宿主への遺伝子発現用の組換えベクターの導入は、常法に従って行うことができる。導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、リチウム法または塩化カルシウム法等が挙げられ、宿主細胞にとって効率の良い手法が選択される。PF1022物質生産菌を宿主として用いる場合、好ましくはポリエチレングリコール法である。

形質転換体の培養は常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュークロース、セルロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、ファーマメディア、コーン・スティープ・リカー、綿実粕、ブイヨン、ペプトン、ポリペプトン、マルトエキス、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸およびその他のイオンを生成することのできる無機塩類、例えば塩化カリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素2カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸1カリウム、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸銅を添加することも有効である。また、必要に応じてチアミン（チアミン塩酸塩等）等の各種ビタミン、グルタミン酸（グルタミン酸ナトリウム等）、アスパラギン（DL-アスパラギン等）等のアミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、環状デプシペプチドの生産を促進するような有機物および無機物を適当に添加することができる。

培養法としては、好気的条件での振とう培養法、通気攪拌培養法または深部好気培養法により行うことができるが、特に深部好気培養法が最も適している。培地のpHは、例えばpH6～pH8程度である。培養に適当な温度は、15°C～40°Cであるが、多くの場合26°C～37°C付近で生育する。環状デプシペプチド合成酵素および環状デプシペプチドの生産は、培地および培養条件、または使用した宿主により異なるが、いずれの培養法においても通常2日～25日間でその蓄積が最高に達する。

培養中の環状デプシペプチド合成酵素、あるいは環状デプシペプチドの量が最高になった時に培養を停止し、培養物から環状デプシペプチド合成酵素あるいは環状デプシペプチドを単離、精製する。

培養物から環状デプシペプチド合成酵素あるいは環状デプシペプチドを採取するためには、その性状を利用した通常の分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマトグラフィー法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法、結晶化法等を単独で、または適宜組み合わせて抽出精製することができる。

環状デプシペプチド合成酵素は、例えば、ブチルアガロース等を使用した疎水性クロマトグラフィーにより効率よく精製できる。

環状デプシペプチドは、例えば、培養物中からはアセトン、メタノール、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等で抽出できる。環状デプシペプチドをさらに精製するには、シリカゲル、アルミナ等の吸着剤、セファデックス LH-20 (ファルマシア社) またはトヨバールHW-40 (東ソー社) 等を用いるクロマトグラフィーを行うと良い。以上のような方法により、またはこれらを適宜組み合わせることにより、純粋な環状デプシペプチドが得られる。

本発明によれば、環状デプシペプチドの大量生産系が提供される。環状デプシペプチドの生産系、特にPF1022物質の生産系として使用できる宿主としては、PF1022物質を生産する糸状菌が好ましく、最も好ましくはPF1022菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) である。形質転換に用いられる組換えベクターとしては、PF1022物質生産菌で機能する制御配列 (プロモーター、ターミネーター等) を環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターが好ましく、最も好ましくはPF1022菌株 (Mycelia ster

ilia、FERM BP-2671）において機能する制御配列を環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターである。環状デプシペプチド、特に P F 1 0 2 2 物質は、好ましくは、P F 1 0 2 2 物質生産菌で機能する制御配列が環状デプシペプチド合成酵素遺伝子に作動可能に連結された発現ベクターによって形質転換された P F 1 0 2 2 物質生産菌を培養し、培養物から環状デプシペプチドを単離することにより製造できる。

P F 1 0 2 2 物質の基質であるL-ロイシン、D-乳酸、またはD-フェニル乳酸を合成しない宿主においては、不足する基質または基質の誘導体を添加して培養することにより、P F 1 0 2 2 物質またはP F 1 0 2 2 物質の誘導体を生産させることが可能である。

実 施 例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1：P F 1 0 2 2 物質生産菌からの環状デプシペプチド合成酵素遺伝子のクローニング

1. ゲノムDNAの単離とゲノムライブラリーの作製

ゲノムDNAは、P F 1 0 2 2 菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) に対して UV照射またはNTG処理により突然変異を誘発し、P F 1 0 2 2 の生産性を向上させた P F 1 0 2 2 物質生産菌432-26株から抽出した。P F 1 0 2 2 物質生産菌432-26株を50 mlの種培地 [1%イーストエキス、1%マルトエキス、2%ポリペプトン、2.5%グルコース、0.1%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム (pH 7.0)] で26°Cにて2日間培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒を用いて磨碎した。この磨碎した菌体からISOP LANT (ニッポンジーン社) により、添付のプロトコールに従いゲノムDNAを単離した。単離したゲノムDNAをSau3A Iにより部分分解した後、アガロースゲル電気泳動により15 kb～20 kbのDNA断片を回収し、これをアルカリリフォスファターゼで処理し、DNA断片の末端を脱リン酸化した。このDNA断片をファージベクターのLambda DASH II (ストラタジーン社) に挿入した。このようにして得られた組換えファージベクターについて、GigapackIII Gold Packaging Extract (ストラタジー

ン社)により、添付のプロトコールに従って *in vitro* パッケージングを行った。その後、この組換えファージを大腸菌XL1-Blue MRA (P2)株に感染させ、プレートにて培養しプラークを形成させた。

2. 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の部分DNA断片の単離

既知のペプチド合成酵素のマルチプルアライメントを行い、良好に保存された領域として、WTSMYDG (配列番号3) とVVQYFPT (配列番号4) を見出した。これらの配列を元に、5' - TGGACIWSNATGTAYGAYGG -3' (配列番号5) および5' - GTIG GRAARTAYTGIACNAC -3' (配列番号6) のプライマーを合成した。これらのプライマーを用い、P F 1 0 2 2 物質生産菌から単離したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは、50 μ lの反応液中、ゲノムDNA50 ngを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、および10 μ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 3分間、[94°C 1分間、65°C (1サイクル毎に0.5°C下げる) 1分間、72°C 1分間] \times 30回、72°C 3分間。この反応により約350 bpのDNA断片が増幅し、このDNA断片をOriginal TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を用い、添付のプロトコールに従ってpCR2.1プラスミドベクターに挿入した。

このようにしてクローニングしたDNA断片の塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイオシステムズ社) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。その結果、単離したDNA断片の塩基配列は、ペプチド合成酵素遺伝子と相同性を示し、目的とする環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の一部であることが明らかとなった。

3. 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子全域のクローニング

ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用したプローブは、PCRにより、フルオレセイン標識dUTPをDNA断片に取り込ませることにより調製した。PCRは、50 μ lの反応液中、100 ngの環状デプシペプチド合成酵素遺伝子DNA断片が挿入されたpCR2.1プラスミドベクターを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社) および添付のバッファー、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.02 mM dTTP、0.18 mM フルオレセイン標識dUTP (FluoroGreen、アマシャム フ

アルマシア バイオテク社) および10 μ Mのプライマー (配列番号5および配列番号6) を用い、以下の条件で反応を行った。94°C 2分間、(94°C 30秒間、55°C 1分間、72°C 1分間) \times 25回、72°C 3分間。この反応により、約350 bpのフルオレセイン標識プローブが作製された。

実施例1の1において作製したブラークの形成されたプレート上に、Hybond-N +メンブレン (アマシャム ファルマシア バイオテク社) を載せ、ブラークを付着させた。このメンブレンをアルカリ処理し、メンブレン上の組換えファージDNAを1本鎖に変性しメンブレンに吸着させた。ファージDNAが吸着したメンブレンを、Hybridization Buffer Tablets (アマシャム ファルマシア バイオテク社) を用いて調製したバッファーに入れた後、60°Cで1時間インキュベートした。これに、上記のフルオレセインでラベルされたプローブを熱変性して添加し、60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを1×SSC (SSC: 15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム) - 0.1% SDS溶液中で60°C、15分間洗浄し、さらに、0.2×SSC-0.1% SDS溶液中で60°C、15分間洗浄した。フルオレセインが結合したブラークの可視化は、DIG洗浄ブロックバッファーセット (ベーリンガー・マンハイム社) 、アルカリifikオスファターゼでラベルされた抗フルオレセイン抗体 (Anti-fluorescein-AP, Fab fragment、ベーリンガー・マンハイム社) 、発色基質としてニトロブルーテトラゾリウムクロライド (ベーリンガー・マンハイム社) およびX-フォスフェート (ベーリンガー・マンハイム社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。このようにしてプローブに相同な領域の5'上流域および3'下流域を含む陽性クローンを選抜した。

4. 塩基配列の決定

このようにして単離された陽性クローン中のDNA断片を、ファージベクターの配列である5' - GCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACGAA - 3' (配列番号7) および5' - GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGAA - 3' (配列番号8) をプライマーとして用い、PCRにより増幅した。PCRは、50 μ lの反応液中、陽性クローンDNA100 ngを錆型とし、2.5 unitのLA Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社) 、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、2.5 mM塩化マグネシウム、および0.2 μ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 1分間、(98°C 10秒間、68°C 15分間) \times 25回、

72°C 15分間。得られたPCR産物を精製した後、ネブライザー処理し、ランダムに0.5 kb~2.0 kbに分解した。この断片の末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、pT7Blue (ノバジェン社) のEcoRV部位に挿入し、大腸菌JM109株に導入した。このようにして得られた168個のコロニーをM13 Primer M4 (宝酒造社) およびM13 Primer RV (宝酒造社) を用いて直接PCRし、これを精製した後、M13 Primer M4 (宝酒造社) をプライマーとしてシークエンスを行った。PCRは、50μlの反応液中、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社) 、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、および0.5μMのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94°C 4分間、(94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 2分間) ×30回、72°C 3分間。また、シークエンスは、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイオシステムズ社) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。

得られた結果から、解析が不十分な領域については、プライマーを解析済みの塩基配列を元に新たに設計してPCRにより増幅し、これを精製した後、PCRに用いたプライマーを用いてシークエンスを行った。これにより、陽性クローン中のDNA断片15606 bpの塩基配列を決定した。

この配列を解析したところ9633 bpからなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、この配列から予測されるタンパク質は、3210アミノ酸残基、354 kDaであり、ペプチド合成酵素と相同性を示すことが明らかとなった。また、最も高い相同性を示したタンパク質はエニアチン合成酵素 (S39842) であり、その相同性は56%であった。このように単離した本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子のORFの塩基配列を配列表の配列番号1に、またそのアミノ酸配列を配列番号2に示した。

実施例2：環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の過剰発現によるPF1022生産性の向上

1. 遺伝子発現用の組換えベクターの構築 (図1)

(1) 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子領域のクローニング

実施例1の3で得られた陽性クローンから、挿入されたDNA断片をNotIにより切

り出し、pBluescriptII KS+ (ストラタジーン社) のNotI部位に挿入し、プラスミドpPF7を作製した。pPF7をBanIIIおよびSmaIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約8250 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。この断片をpBluescriptII KS+に挿入し、プラスミドpPF7-1を作製した。

pPF7を鑄型とし、N末端付近からBanIII部位までの約440 bp (配列番号9および配列番号10を使用) または約470 bp (配列番号11および配列番号10を使用) を増幅するためのプライマーとして、5' - AGCATCGGATCCTAACAAATGGCGTTGAGCAGCAAGC CCTA -3' (配列番号9、ORFのN末端から10番目のMetから翻訳開始するように設計) または5' - AGCATCGGATCCTAACAAATGTCAAACATGGCACCCACTCCCTA -3' (配列番号11、ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始するように設計)、および5' - TTTGCTT CGTACTCGGGTCCT -3' (配列番号10) を用い、また、SmaI部位からC末端までの約920 bpを増幅するためのプライマーとして、5' - GCATCGCGATACTAGAGAAG -3' (配列番号12) および5' - AGCATCGAATTGGATCCCTAACCAACGCCAAAGCCCAGAAT -3' (配列番号13) を用いてPCRを行った。この際、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の5'側および3'側に、BamHI部位を導入するようにプライマーの設計を行った。PCRは、50 μlの反応液中、150 ngのプラスミドDNAを鑄型とし、2.5 unitのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績社)、添付のバッファーおよびdNTP Mixture、1 mM塩化マグネシウム、および0.5 μMのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。98°C 30秒間、(98°C 15秒間、65°C 2秒間、74°C 30秒間) ×10回、74°C 1分間。各プライマーを用いて得られたPCR反応液をエタノール沈殿し、PCR産物を回収した。N末端領域に関しては、BamHIおよびBanIIIにより、また、C末端領域に関しては、SmaIおよびBamHIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、DNA断片をアガロースゲルから回収した。

pPF7-1のSmaI、BamHI部位に、上記のC末端領域PCR断片を挿入し、プラスミドpPF7-2を作製した。このプラスミドをBanIIIおよびBamHIで切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約9170 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。このDNA断片並びに配列番号9および配列番号10を用いて作製したN末端領域を、同時に、pBluescript II KS+のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsyn(ORFのN末端から10番目の

Metから翻訳開始)を作製した。

一方、pPF7-2から切り出した約9170 bpのDNA断片並びに配列番号9および配列番号11を用いて作製したN末端領域を、同時に、pHSG299(宝酒造社)のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。このようにして両末端にBamHI部位を持つ環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を作製した。

pPFsynまたはpPFsynNをBamHIで切断した後、環状デブシペプチド合成酵素遺伝子領域をそれぞれゲルから回収した。

(2) Abp1遺伝子の発現制御領域を用いた発現ベクターの構築

PF1022物質生産菌のゲノムDNAの単離

PF1022物質生産菌(FERM BP-2671)のゲノムDNAの単離は(H. Horiuchi et. al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988))に記載の方法に従った。具体的には、まずPF1022菌株(FERM BP-2671)を種培地(可溶性澱粉2.0%、グルコース1.0%、ポリペプトン0.5%、小麦胚芽0.6%、酵母エキス0.3%、大豆粕0.2%および炭酸カルシウム0.2%;殺菌前がpH7.0; WO97/00944号実施例1参照)で2日間培養し、遠心分離(3500rpm、10分)によって菌体を回収した。次いで、得られた菌体を凍結乾燥後、TEに懸濁し、3%SDS溶液中、60°C、30分間処理後、TE飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈殿化後、リボヌクレアーゼA(シグマ社製)およびプロテイナーゼK(和光純薬社製)処理し、さらに12%ポリエチレングリコール6000により核酸を沈殿化させた。これをTE飽和フェノール抽出、エタノール沈殿化を行い、同沈殿をTEに溶解し、これをゲノムDNAとした。

PF1022物質生産菌のゲノムライブラリーの作製

上記のように調製したPF1022物質生産菌由来ゲノムDNAをSau3AIにより部分消化した。これをファージベクター、λEMBL3クローニングキット(ストラタジーン社製)のBamHIアームにT4リガーゼ(宝酒造社製ライゲーションキットVer.2)を用いて連結させた。これをエタノール沈殿後、TEに溶解した。連結混合物の全量をギガパックIIIプラスパッケージングキット(ストラタジーン社製)を用いて、大腸菌LE392株に感染させ、ファージplaquesを形成させた。こ

の方法により得られた 1.3×10^4 個 (2.6×10^4 PFU/ml) のファージライブライリーを用いて Abp1 遺伝子のクローニングを行った。

P F 1 0 2 2 物質生産菌由来のゲノムDNAからのAbp1遺伝子クローニング

プローブは Abp1 遺伝子の翻訳領域を PCR 法により増幅し、用いた。前記のように P F 1 0 2 2 物質生産菌から調製したゲノムDNAを鑄型に、8-73U および 8-73R なる合成プライマーを用いて、レツツゴーPCRキット（サワディーテクノロジー社製）に従い PCR を行った。PCR の反応条件は、94°C 30 秒間、50°C 30 秒間、72°C 90 秒間のステップを 25 回繰り返すことにより増幅を行った。以下に 8-73U および 8-73R の DNA 配列を示す。

8-73U: CTCAAACCAGGAACCTCTTC (配列番号 14)

8-73R: GACATGTGGAAACCACATTTG (配列番号 15)

このようにして得られた PCR 産物は ECL ダイレクトシステム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、標識化した。前記のように作成したファージ プラークを、ハイボンド NT+ ナイロントランスファーメンブラン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に転写し、アルカリ変成後、5 倍濃度 SSC (SSC: 15mM クエン酸 3 ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、乾燥させ DNA を固定した。キットに記載の方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション (42°C) の後、先の標識化したプローブを添加し、16 時間 (42°C) ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットに記載の方法に従った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、検出溶液に 1 分間浸したあと、メディカル X 線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、1 個の陽性クローンを得た。本クローンは サザン解析の結果、少なくとも 6kb の Hind III 断片がゲノムDNA の制限酵素断片長と一致していた。この Hind III 断片の制限酵素地図を図 2 に示す。Hind III 断片は pU C119 にサブクローニングし (pRQHin/119)、以降の実験に供した。

発現ベクターの構築

pRQHin/119 を鑄型に Abp1 遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域を PCR 法を用いて増幅した。プロモーターの増幅は ABP-Neco および ABP-Nbam、一方、ターミネーターの増幅は ABP-Cbam および ABP-Cxba なるプライマーを用い、PCR スーパーミックスハイフィデリティ（ライフテックオリエンタル社製）により PCR 法を

行った。反応条件は、94°C30秒間、50°C30秒間、72°C90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下にABP-Neco、ABP-Nbam、ABP-CbamおよびABP-CxbaのDNA配列を示す。

ABP-Neco: GGGGAATTCTGTGGGTGGTGATATCATGGC (配列番号 16)

ABP-Nbam: GGGGGATCCTTGATGGGTTTGGG (配列番号 17)

ABP-Cbam: GGGGGATCCTAAACTCCCATCTATAGC (配列番号 18)

ABP-Cxba: GGGTCTAGACGACTCATTGCAGTGAGTGG (配列番号 19)

各PCR産物はマイクロスピンS-400カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）で精製し、エタノール沈殿化の後、プロモーターはEcoRIおよびBamHI、ターミネーターはBamHIおよびXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpBluescriptII KS+に順次連結した。これをXbaIで消化し、pMKD01 (W098/03667号) 由来デストマイシン耐性カセットを挿入しpABPdを構築した（図3）。pABPdはAbp1遺伝子のプロモーターおよびターミネーターを有する。

前記のようにゲルから回収した環状デプシペプチド合成酵素遺伝子領域をpABPdのBamHI部位に挿入し、環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を発現させるための発現ベクターであるpABP/PFsyn(ORFのN末端から10番目のMetから翻訳開始)およびpABP/PFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。

2. P F 1 0 2 2 物質生産菌への環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の導入と発現

P F 1 0 2 2 菌株 (Mycelia sterilia、FERM BP-2671) への発現ベクターの導入は、W097/00944号に記載された実施例1の方法に従って行い、ハイグロマイシンBに対する耐性度の高い株を選抜した。これらの株における目的遺伝子の導入の確認は、Abp1プロモーターの配列から作製したプライマー、5' - TGATATGCTGGAG CTTCCCT -3' (配列番号 20) および環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の配列から作製したプライマー、5' - GCACAAACCTTTCCAGGCT -3' (配列番号 21) を用いたPCRにより行った。このようにしてハイグロマイシンBに対する耐性度が高く本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子が導入された遺伝子導入株を選抜した。

50 mlの種培地にて遺伝子導入株および親株 (Mycelia sterilia、FERM BP-

2671) をそれぞれ別々に26°Cで2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地 [6%水飴、2.6%澱粉、2%小麦胚芽、1%ファーマメディア、0.2%硫酸マグネシウム7水和物、0.2%炭酸カルシウム、0.3%塩化ナトリウム(pH 7.5)] に接種し、26°Cで4日間培養した。培養液を4500rpmで5分間遠心することにより集菌し、得られたそれぞれの菌体を0.3 M塩化カリウムで洗浄した。それぞれの菌体を液体窒素により凍結した後、凍結乾燥を行った。

以下に示す抽出操作は、氷上、または4°Cの低温室にて実施した。凍結乾燥した菌体10 mgおよび1.0 mlのガラスビーズ(径0.5 mm)を入れた2 mlのマイクロチューブに、1.0 mlの抽出バッファー [50 mMトリス-塩酸(pH8.0)、0.3 M塩化カリウム、60%グリセロール、10 mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム、5 mMジチオスレイトール、10 μ Mロイペプチド、1 mMフェニルメタンスルホン酸、60 μ g/mlキモスタチン] を添加した。このマイクロチューブをMini-Bead-Beater-8(バイオスペック社)にセットし、最高速度で3分間運転することにより抽出を行った。これを15000 rpmで5分間遠心した後、100 μ lの上清を100 μ lの10%トリクロロ酢酸溶液中に入れ、混合した。15分間放置した後、15000 rpmで10分間遠心し、得られた沈殿を、15 μ lのアルカリ溶液(2%炭酸ナトリウム、0.4%水酸化ナトリウム)に溶解し、60 μ lのサンプルバッファー [125 mMトリス-塩酸(pH6.8)、20%グリセロール、4%ドテシル硫酸ナトリウム、10%2-メルカプトエタノール、50 mg/l ブロムフェノールブルー] を添加した。これを沸騰水中で5分間加熱した後、電気泳動システム(テフコ社)により、4%~20%のポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動 [Sodium Dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)] を行った。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルは、クイック-CBB(和光純薬社)を用い、添付のプロトコールに従い染色した。親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を図4に示した。また、親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を図5に示した。

このように、遺伝子導入株の環状デブリペプチド合成酵素の発現量は、親株に比べ顕著に高かった。

3. P F 1 0 2 2 物質の抽出と定量

50 mlの種培地にて遺伝子導入株および親株をそれぞれ別々に26°Cで2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地に接種し、26°Cで6日間培養した。それぞれの培養液から10 ml分を採取し3000 rpmで10分間遠心し、別々に集菌した。それぞれの菌体に10 mlのメタノールを加えて激しく振とうし、30分間静置した。その後、再度振とうし、3000 rpmで10分間遠心した後、上清中のそれぞれの菌体から抽出したP F 1 0 2 2 物質を液体クロマトグラフィーにより各々定量した。カラムとしては、LiChrospher 100 RP-18 (e) (関東化学社) を用い、カラム温度は40°C、移動相は80%アセトニトリル、流速は1.0 ml/minとして、210 nmの吸収によりP F 1 0 2 2 物質を検出した。この条件におけるP F 1 0 2 2 物質の保持時間は5分間～6分間であった。実験は2反復でを行い、親株およびpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したP F 1 0 2 2 物質の定量結果の平均値を表1に示した。

表1

P F 1 0 2 2 物質 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

親株	8 8
遺伝子導入株	2 2 2

遺伝子導入株は親株の約2.5倍のP F 1 0 2 2 物質の生産性を示した。本発明の環状デブリペプチド合成酵素を過剰発現させることにより、P F 1 0 2 2 物質の生産性が高まることが明らかとなった。

また、親株およびpABP/PFsynNを導入した遺伝子導入株から抽出したP F 1 0 2 2 物質の定量結果の平均値を表2に示した。

表2

P F 1 0 2 2 物質 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

親株	2 9
遺伝子導入株 1	1 2 3
遺伝子導入株 2	1 3 6
遺伝子導入株 3	1 7 2

遺伝子導入株は親株の4.3~6.0倍のP F 1 0 2 2物質の生産性を示した。本発明の環状デプシペプチド合成酵素を過剰発現させることにより、P F 1 0 2 2物質の生産性が高まることが明らかとなった。

請求の範囲

1. 下記からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質：
 - (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、および
 - (b) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有する配列番号 2 のアミノ酸配列の改変アミノ酸配列。
2. 請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
3. 配列番号 1 の DNA 配列からなる、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。
4. 下記からなる群から選択されるポリヌクレオチド：
 - (c) 配列番号 1 の DNA 配列、
 - (d) 配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 70 % の同一性を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、
 - (e) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする配列番号 1 の DNA 配列の改変 DNA 配列、および
 - (f) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の DNA 配列とハイブリダイズし、かつ環状デプシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列。
5. (d) が配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 80 % の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。
6. (d) が配列番号 1 の DNA 配列と少なくとも 90 % の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。
7. 請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、組換えベクター。
8. 請求項 7 に記載の組換えベクターを含んでなる宿主。
9. 環状デプシペプチド合成酵素を発現している、請求項 8 に記載の宿主。
10. P F 1 0 2 2 物質生産菌である、請求項 8 または 9 に記載の宿主。

11. 請求項 8～10 のいずれか一項に記載の宿主を培養し、培養物から環状デプシペプチドを採取することを含んでなる、環状デプシペプチドの製造法。

12. 環状デプシペプチドが P F 1 0 2 2 物質およびその誘導体である、請求項 11 に記載の製造法。

13. 請求項 8～10 のいずれか一項に記載の宿主を培養し、培養物から環状デプシペプチド合成酵素を採取することを含んでなる、環状デプシペプチド合成酵素の製造法。

14. 環状デプシペプチドが P F 1 0 2 2 物質およびその誘導体である、請求項 13 に記載の製造法。

1 / 4

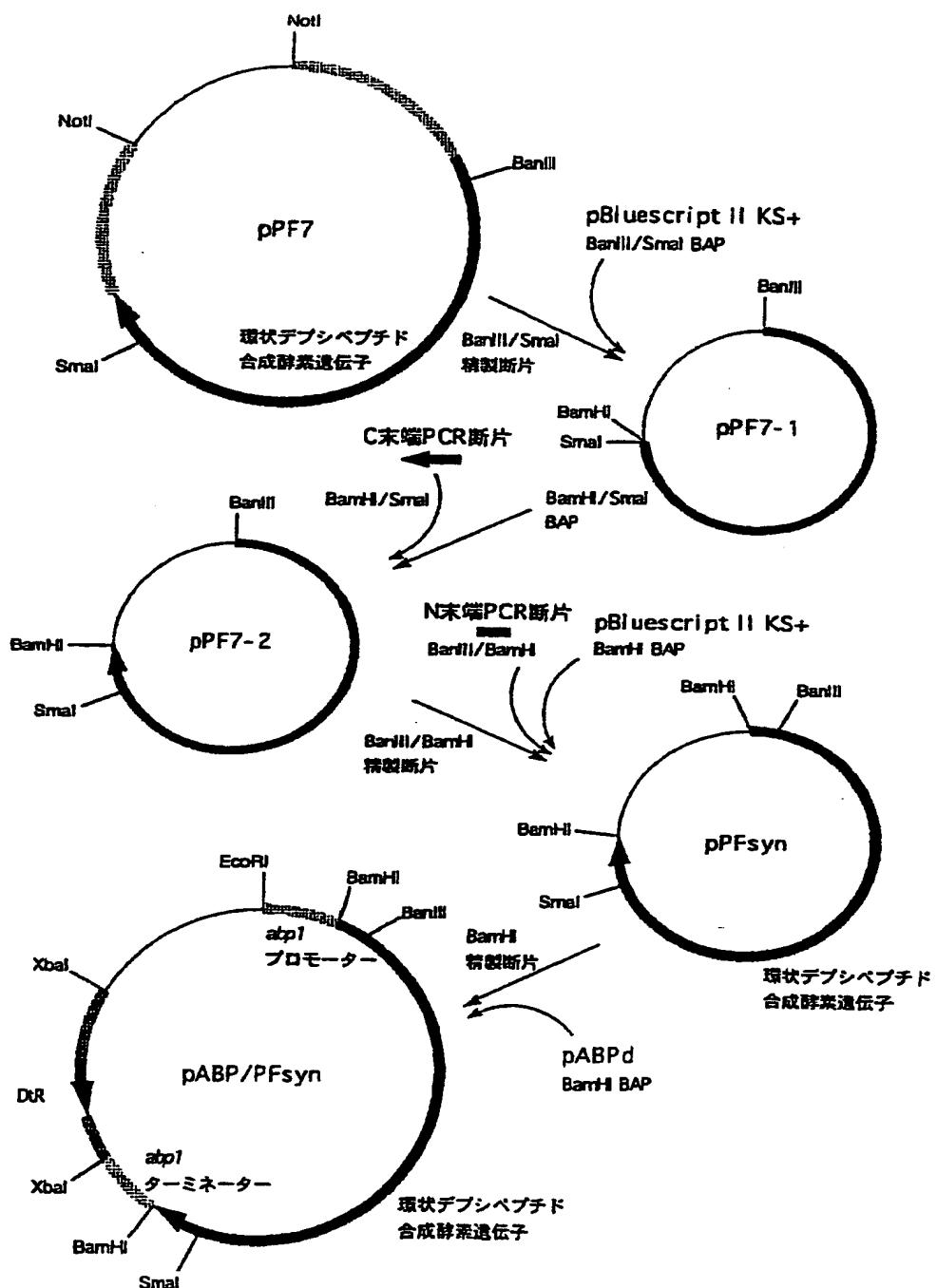


FIG. 1

WO 01/18179

2/4

PCT/JP00/06103

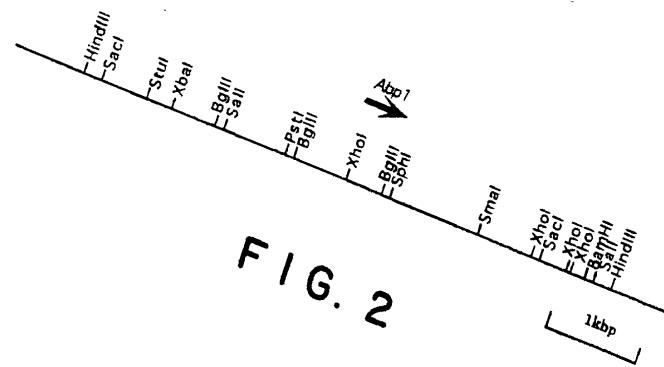


FIG. 2

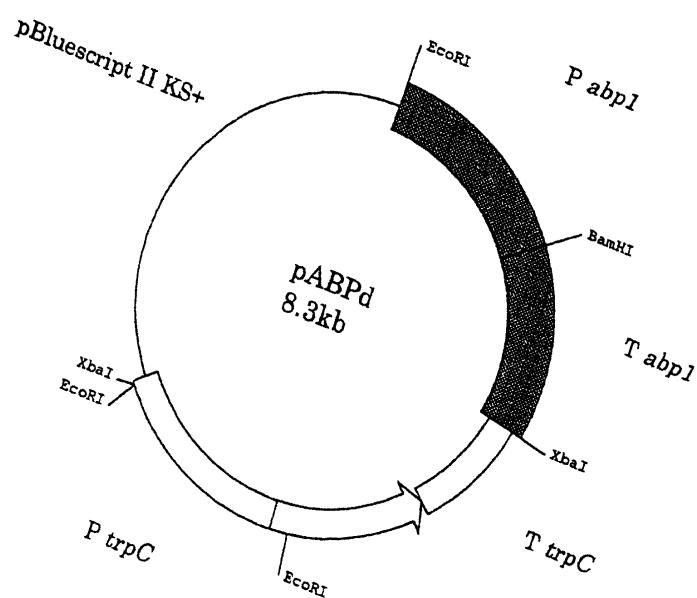
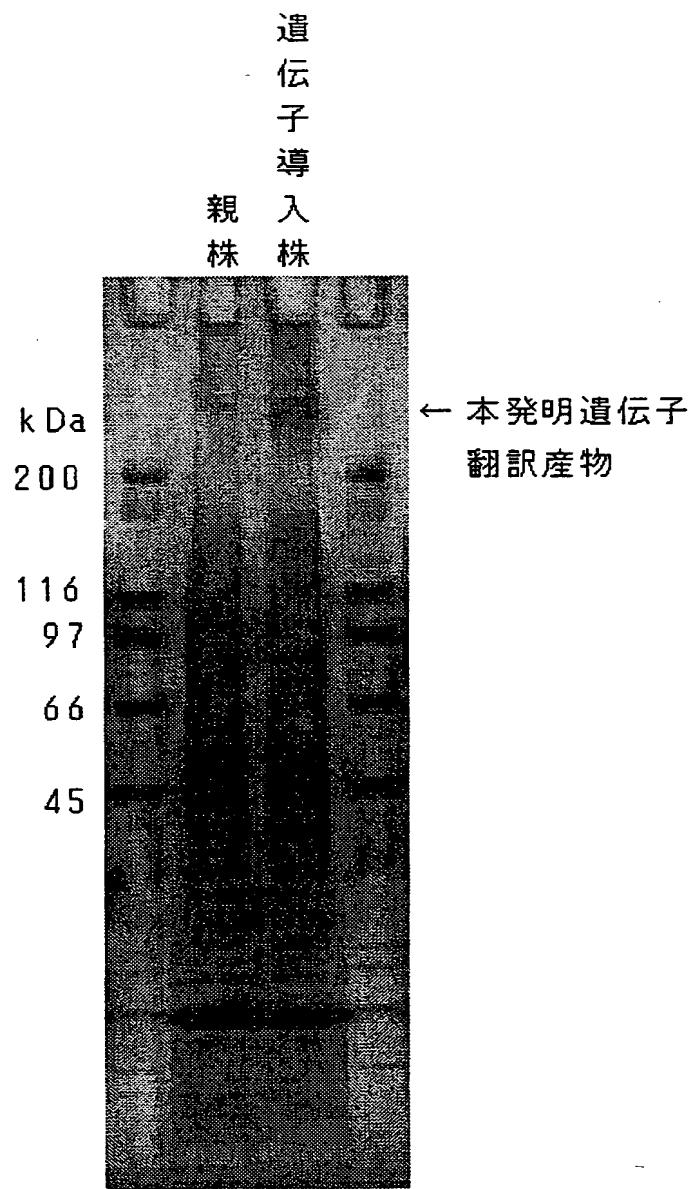


FIG. 3

3/4



F I G. 4

4/4

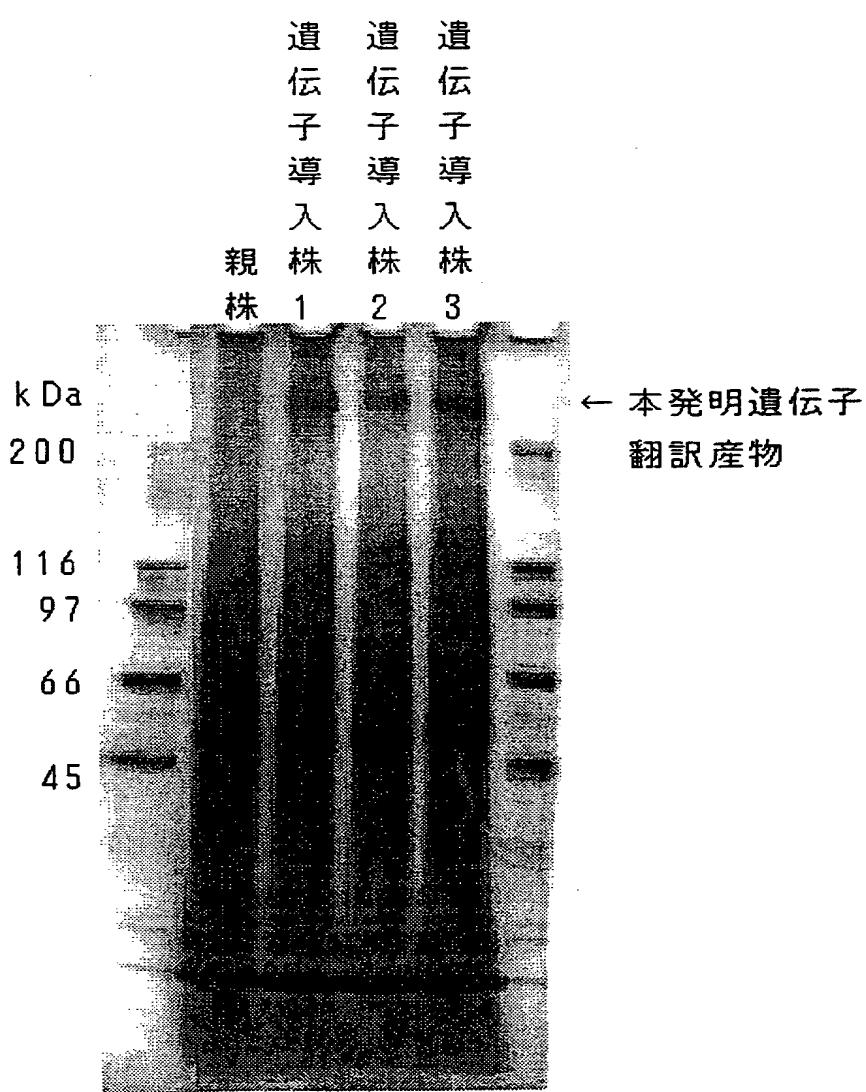


FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Cyclic depsipeptide synthetase and its gene and mass production system of cyclic depsipeptide

<130> 127184

<150> JP 253040/1999

<151> 1999-09-07

<150> JP 104291/2000

<151> 2000-04-06

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9633

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(9633)

<223> peptide synthetase for PF1022

<220>

<221> mat_peptide

<222> (13)..(9630)

<400> 1

atg tca aac atg gca cca ctc cct acg atg ggc gtt gag cag caa gcc 48
Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala
-1 1 5 10

cta tca ctt tca tgc ccc tta ctc cct cat gac gat gag aaa cac tca 96
Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser
15 20 25

gac aac ctt tac gag caa gca act cgg cac ttc ggc ttg agc cga gac 144
Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp
30 35 40

aag atc gaa aat gtc tta cca tgt act tcc ttt caa tgt gat gtc ata 192
Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile
45 50 55 60

gat tgc gcc gtc gac gat cgg cgg cat gct atc ggt cac gtc gtc tat 240
Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr
65 70 75

gat atc ccc aat aca gtg gac atc cag cgt tta gcc gca gcc tgg aaa 288
Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys
80 85 90

gag gtt gtg cgg cag aca cca atc ttg agg acc ggc atc ttt aca tca 336

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser -
95 100 105

gaa acc ggc gac tct ttt cag atc gtc ttg aaa gaa ggc tgc cta ccg 384
Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro
110 115 120

tgg atg tac gcg aca tgt ctc ggc atg aag ggg gca gtg ata caa gat 432
Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp
125 130 135 140

gaa gca gtc gcc gct atg act gga ccg cgt tgc aat cga tat gtc gtc 480
Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val
145 150 155

ctg gag gac ccg agt acg aag caa agg ctg ctc atc tgg aca ttc agc 528
Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser
160 165 170

cat gct tta gtg gat tat aca gtc cag gaa cgc atc ctt cag cgg gtt 576
His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val
175 180 185

ctc aca gta tac gac ggc cgg gac gtc gag tgc cct cgc atc aag gat 624
Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp
190 195 200

aca gaa cat gtc tct cgg ttt tgg caa caa cac ttt gaa ggc tta gat 672
Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp
205 210 215 220

gcc tcc gta ttt ccc ctt cta cca tct cac cta act gtg tgc aat ccc 720
Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro
225 230 235

aat gcg cgc gca gaa cat cat atc tca tac acg gga cca gtc cag agg 768
Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg
240 245 250

aag tgg tcc cat aca agt atc tgt cgg gct gca ctc gca gtt ctt cta 816
Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu
255 260 265

tct cgc ttt aca cac tct tcg gag gcc ctc ttc ggt gtt gtg aca gaa 864
Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu
270 275 280

caa tct cac aac tcc gag gac caa aga cgg tca att gat ggc ccc gca 912
Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala
285 290 295 300

agg aca gta gtg cct atc cgc gtc ctt tgt gcc cca gat caa tat gtg 960
Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val
305 310 315

tcg gat gtc att ggg gca atc acc gca cac gaa cac gcc atg cgc ggg 1008
Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly
320 325 330

ttt gag cac gct gga ctt cgc aat atc cgc cgt acc gga gac gac ggg 1056
Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly
335 340 345

tct gct gct tgt gga ttc cag acc gtg cta ctg gtg act gac ggt gat 1104
Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp
350 355 360

gct ccc aag acc cct ggg agt gta ctt cat cga agt gta gaa gaa tcg 1152
Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser
365 370 375 380

gat aga ttc atg ccc tgc gct aat cgt gcc ctt ctg ctc gac tgc cag 1200
Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln
385 390 395

atg gct ggc aac tcg gca tcc cta gtc gca cga tat gat cat aat gtg 1248
Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val
400 405 410

atc gac cca cgc cag atg tct cgc ttc ctg cga cag cta gga tac ctg 1296
Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu
415 420 425

atc caa caa ttt cat cat cac gtc gat ctg cct ctg gtc aaa gaa ctg 1344
Ile Gln Gln Phe His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu
430 435 440

gac gtc gtg acg gcg gag gat tgt gcg gaa atc gag aaa tgg aat tca 1392
Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser
445 450 455 460

gaa cgc cta aca atg caa gac gcc tta atc cac gac acc ata tcc aag 1440
Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys
465 470 475

tgg gct gct ggc gat ccc aac aaa gct gca gtt ttc gct tgg gat ggg 1488
Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly
480 485 490

gaa tgg aca tac gcc gag cta gac aac ata tcc tcc cgt ctc gcc gtg 1536
Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val
495 500 505

tat atc caa tcc ctg gac ttg aga cca gga caa gca ata ctc cca ctc 1584
Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu
510 515 520

tgc ttc gag aag tca aaa tgg gtc gtc gcc aca att ctc gcc gtc ctc 1632
Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu
525 530 535 540

aaa gtc ggt cgg gca ttc aca ctc atc gac ccg tgc gac ccc tcg gca 1680
Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala
545 550 555

agg atg gcc cag gtc tgt cag cag acc tcc gcc aca gtc gct ctc acc 1728
Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr
560 565 570

tcc aaa ctc cac aac acc acc tta cgt tcc gtc gtt tcc cgc tgc att 1776
Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile
575 580 585

gtg gtc gac gac gac ctc ctt cgg tcc tta ccc cac gcc gat ggc cgc 1824
Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg
590 595 600

tta aag gcc acc gtg aag cca cag gac ttg gcc tat gtt att ttc aca 1872
Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr
605 610 615 620

tct ggc agc aca gga gag ccg aaa ggc atc atg atc gaa cat cgg ggg 1920
Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly
625 630 635

ttc gtg tcg tgt gct atg aaa ttt ggc ccc gcg ctc gga atg gat gag 1968
Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu
640 645 650

cac acg cgc gct ctt caa ttc gcc tca tat gcg ttt ggc gct tgt ctg 2016
His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu

655 660 665

gta gaa gtt gtg aca gct ctg atg cac ggc ggc tgc gtc atc cct 2064
Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro

670 675 680

tcc gat gac gat cgc ttg aac aat gta ccg gag ttc atc aaa agg gcc 2112
Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala
685 690 695 700

cag gtg aac tgg gtg ata ctc act ccg tgc tat atc ggg aca ttc cag 2160
Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln
705 710 715

ccg gaa gat gtc cct gga cta caa aca ctg gta ttg gtt gga gaa cct 2208
Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro
720 725 730

atc tca gcg tct att cgg gat acc tgg gcc tcc cag gtt cga ctc ctg 2256
Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu
735 740 745

aat gcc tac ggt cag agt gaa agc tca act atg tgc agc gtc acg gaa 2304
Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu
750 755 760

gtc agc ccg ctc tcc ctc gaa ccg aac aat atc ggt cgg gct gta ggc 2352
Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly
765 770 775 780

gca cga tcc tgg atc att gat ccc gac gag cct gat cgt ctt gct cca 2400
Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro
785 790 795

att ggc tgc att gga gag cta gtg atc gaa agt ccg ggc att gcg cgc 2448
Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg
800 805 810

gac tat atc atc gcg ccg ccg gac aag tcc ccc ttt ctc cta gca 2496
Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala
815 820 825

ccc ccg gcc tgg tat cca gcc ggg aaa tta tcc aac gcc ttt aaa ttt 2544
Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe
830 835 840

tac aag act gga gat ctc gtg cgt tat gga cct gac ggc acc atc gtc 2592
Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val
845 850 855 860

tgc ctg gga cgc aaa gat tcg caa gtg aag atc cga ggg cag cgc gta 2640
Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val
865 870 875

gag atc agc gca gtg gaa gcc agt cta cga cga caa cta cct agt gac - 2688
Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp

880 885 890

atc atg ccc gtg gcc gaa gct atc aaa cgc tcg gat tcg tca ggc agc 2736
Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser
895 900 905

aca gtc ttg act gcc ttc ttg ata ggg tca tct aag agc gga gat ggt 2784
Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly
910 915 920

aat ggc cac gct tta tct gcg gca gac gcc gtt atc ttg gat cac ggt 2832
Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly
925 930 935 940

gct acc aac gag ata aac gcg aag ttg cag caa atc ctt ccc cag cat 2880
Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His
945 950 955

tcc gtt cca tcc tat tat atc cac atg gaa aat ctt cct cga act gcc 2928
Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala
960 965 970

acc ggc aaa gcg gac agg aaa atg ctt cga tct att gct agc aag cta 2976
Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu
975 980 985

ttg ggt gaa ttg tct cag aac gtg aca tct caa ccg att gag aag cac 3024
Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His
990 995 1000

gat gcc cca gca act ggt ata gag gtc aag ctg aag gag ctt tgg ttt 3072
Asp Ala Pro Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe
1005 1010 1015 1020

ctg agc ttg aat ctt aat ccc aac tct caa gat gtc gga gcg agt ttc 3120
Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe
1025 1030 1035

ttt gac tta ggc gga aat tcc att atc gcc atc aaa atg gta aac atg 3168
Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met
1040 1045 1050

gcg agg tca gct ggg ata gca ctg aag gta tcc gac ata ttc cag aat 3216
Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn
1055 1060 1065

ccc acg ctc gcc ggc ctt gtg gat gtc atc ggg cga gac ccg gct ccg 3264
Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro
1070 1075 1080

tac aac ctc atc cca aca aca gca tac agc gga cct gtt gag cag tcg 3312
Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser
1085 1090 1095 1100

ttc gcc cag ggc cgt cta tgg ttc ttg gac cag atc gaa ctc gat gcg 3360
Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala
1105 1110 1115

ttg tgg tac ctt cta cca tac gcc gtt cgc atg cgc ggg cca ttg cat 3408
Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His
1120 1125 1130

att gat gcg ctc act att gcg ttg cta gct ata cag caa cga cat gaa 3456
Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu
1135 1140 1145

acc ttg cgg aca acc ttt gag gag cag gac ggc gta ggc gtt cag gtt 3504
Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val
1150 1155 1160

gtc cat gcg agc ccc atc tcc gac ttg agg ata atc gac gta tca ggc 3552
Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly
1165 1170 1175 1180

gac cga aac agt gac tac ctc cag ttg cta cac caa gag cag acg act 3600
Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr
1185 1190 1195

cca ttc att cta gca tgt cag gca gga tgg agg gta tca ctg att aga 3648
Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg
1200 1205 1210

cta gga gaa gat gat cac atc ctc tct atc gta atg cat cac atc atc 3696
Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile

1215 1220 1225

tcc gac ggc tgg tct atc gac att cta cgc cgg gaa cta agc aat ttc 3744
Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe

1230 1235 1240

tat tca gcc gct ctc cgg ggc tct gat cct cta tcg gtg gtg agc cca 3792
Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp-Pro Leu Ser Val Val Ser Pro
1245 1250 1255 1260

ctc cca ctc cac tac cgc gac ttt tcc gtt tgg caa aag cag gtc gaa 3840
Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu
1265 1270 1275

cag gag acc gaa cat gag cgg caa ctc gaa tac tgg gtc aag cag ctc 3888
Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu
1280 1285 1290

gca gac agc tcg gcc gaa ttc cta acc gac ttc ccc cga ccc aac 3936
Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn
1295 1300 1305

ata ctg tcc ggt gaa gca ggt tcc gtg cca gtg acg atc gaa ggc gaa 3984
Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu
1310 1315 1320

ctg tat gaa agg ctc caa gaa ttc tgt aaa gta gag caa atg acg cct 4032
Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro
1325 1330 1335 1340

ttc gcc gtg ttg tta ggg gcc ttc cgc gcg acc cat tat cgt ctc acc 4080
Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr
1345 1350 1355

ggc gcc gaa gac tcg atc atc ggc acg ccc atc gcg aac cgc aac cgc 4128
Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg
1360 1365 1370

cag gag ctt gaa aac atg atc ggc ttc ttc gtc aac acc caa tgc atg 4176
Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met
1375 1380 1385

cga atc acg gtc gac ggc gac gac act ttt gaa agc ctg gtg cga caa 4224
Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln
1390 1395 1400

gtt cgg acc acg gcg acg gcg gca ttc gag cac caa gac gtc ccc ttt 4272
Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe
1405 1410 1415 1420

gag cgc gtc gtg acg gca ctc ctt cca cgc tcg aga gac cta tcc cga 4320
Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg
1425 1430 1435

aac cca cta gca cag ctc acc ttc gct ctt cat tct caa cag gac ctc 4368
Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu
1440 1445 1450

ggc aag ttc gag ctg gag ggt ctc gta gcg gaa ccc gtc tcg aac aag 4416
Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys
1455 1460 1465

gta tac acc agg ttc gac gtg gag ttt cac ctg ttc caa gaa gcc gga 4464
Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly
1470 1475 1480

aga cta agc ggt aac gtg gca ttt gcg gca gat cta ttc aag cct gag 4512
Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu
1485 1490 1495 1500

acc att agc aat gta gtc gcc ata ttt ttc caa atc ctg cga caa ggc 4560
Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly
1505 1510 1515

att cgc cag cct cgg act cca atc gct gtt ctc ccg ctt acc gat ggg 4608
Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly
1520 1525 1530

tta gcg gac ctt cgt gcc atg ggc ttg ctt gag atc gag aag gca gaa 4656
Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu
1535 1540 1545

tac ccg cgg gag tcg agc gtc gtc gac gtc ttc cgc aag cag gtg gcc 4704
Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala
1550 1555 1560

gct cac ccg cac gct ttt gcc gtt gtc gat tcg gca tcg cgc ctc aca 4752
Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr
1565 1570 1575 1580

tat gct gat ctc gat cgt caa tcc gat caa ctc gcg acc tgg ctc ggt 4800
Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly
1585 1590 1595

cgg cgc aat atg acg gct gag acg ctg gtc ggg gtg tta gca ccg cgg 4848
Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg
1600 1605 1610

tca tgt caa aca gtt gtt gcc att tta ggt atc ctg aaa gcg aat ctc 4896
Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu
1615 1620 1625

gca tat ctc ccg ctt gat gtg aat tgt cct acc gcc cgc ctg caa aca 4944
Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr
1630 1635 1640

atc cta tct aca ttg aat cgg cac aag ttg gtc cta ctc ggc tct aac 4992
Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn
1645 1650 1655 1660

gca act act ccg gat gtc cag ata cct gat gta gag ctg gta cga atc 5040
Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile

1665

1670

1675

agc gat atc tta gat cgc ccc atc aat ggc cag gca aag cta aat ggt 5088
Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly

1680

1685

1690

cat aca aaa tcg aat ggc tac tca aag cca aac ggc tat acg cat ctg 5136
His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu

1695

1700

1705

aaa ggc tat tca aac cta aac ggt tat tca aaa caa aat ggt tat gca 5184
Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala

1710

1715

1720

caa ctc aac ggc cat aga gag cgt aac aat tat tta gat cta aat ggg 5232
Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly
1725 1730 1735 1740

cac tca ctg cta aat ggg aat tca gac atc acc aca tca ggg ccc tca 5280
His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser
1745 1750 1755

gca aca agc ctt gcc tac gtg atc ttc aca tcc ggc tca acc gga aag 5328
Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys
1760 1765 1770

ccc aaa gga gtc atg gtc gaa cac cgc agc atc atc cga ctt gca aag 5376
Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys
1775 1780 1785

aag aac aga atc ata tcc agg ttc cca tct gta gcc aag gta gct cac 5424
Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His
1790 1795 1800

ctc tca aac atc gcc ttt gac gcc act tgg gaa atg ttc gca gcc 5472
Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala
1805 1810 1815 1820

ctt cta aac ggc gga acg ctg gtc tgt atc gac tat atg acc acc ctg 5520
Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu
1825 1830 1835

gac agc aaa acg ctc gag gcc gcg ttt gca cga gaa caa atc aac gcc 5568
Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala
1840 1845 1850

gcg tta ctc acg ccc gct ttg ttg aag cag tgc cta gcc aac att ccc 5616
Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro
1855 1860 1865

act acc cta ggc agg ctg agt gca ctc gtt att gga ggt gat agg ctt 5664
Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu
1870 1875 1880

gac ggc caa gac gcg atc gca gca cat gcg ctt gtc ggt gct ggc gtg 5712
Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val
1885 1890 1895 1900

tat aat gcg tat ggc ccg acc gaa aac gga gtg atc agt acg att tat 5760
Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr
1905 1910 1915

aat atc act aaa aac gac tcg ttc atc aac gga gtc ccc atc ggc tgt 5808
Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys
1920 1925 1930

gca atc agc aat tcc ggc gcc tac atc aca gac cca gac cag cag ctc 5856
Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu
1935 1940 1945

gta cct cct ggc gtc atg ggt gaa ctc gtc gtt acc ggt gac ggg ctc 5904
Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu
1950 1955 1960

gcg cgg ggg tat aca gac cca gca cta gac gcg ggc cgc ttc gtc cag 5952
Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln
1965 1970 1975 1980

atc atg atc aat gac aag gcc gtg agg gcg tac cga acg ggt gac cgg 6000
Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg
1985 1990 1995

gca cga tat cgc gta gga gac ggt cag atc gag ttc ttc gga cgc atg 6048
Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met

2000

2005

2010

gat cag caa gtc aag atc cga ggt cac cgc att gaa cca gcc gaa gtg 6096
Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val

2015

2020

2025

gag cgt gct att ctc gac caa gac tcg gcc cgc gac gcc gtc gtt gtc 6144
Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val

2030

2035

2040

atc cgg cac caa gaa ggt gaa gaa ccg gag atg gtt ggt ttc gtc gcg 6192
Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala
2045 2050 2055 2060

acc cac ggc gat cac tct gcc gaa caa gag gaa gca gac gac cag gtt 6240
Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Glu Ala Asp Asp Gln Val
2065 2070 2075

gaa ggt tgg aaa gac ttc ttc gag agc aat aca tat gcc gac atg gat 6288
Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp
2080 2085 2090

acc atc ggc cag tct gct ata ggc aac gac ttt acg ggc tgg acg tcc 6336
Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser
2095 2100 2105

atg tac gac ggg agc gag atc aac aag gcc gag atg cag gag tgg ctc 6384
Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu

2110 2115 2120

gac gac acc atg cgc aca ctc ctc gat ggc caa gcg ccg ggt cac gta 6432
Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val
2125 2130 2135 2140

ctc gaa ata ggc aca ggc agt ggc atg gta ttg ttt aac tta ggg gcc 6480
Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala
2145 2150 2155

ggg cta caa agc tac gta ggt ctt gaa cca tct aga tct gca gcc acg 6528
Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr
2160 2165 2170

ttt gtt acc aaa gcg atc aat tcc acc cca gct ctt gca gga aag gcc 6576
Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala
2175 2180 2185

gaa gtg cac gtc ggc aca gcg aca gac ata aac cga ctt cgt gga ctt 6624
Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu
2190 2195 2200

cgt ccc gat cta gtt gtg ctc aac tcg gta gtc cag tat ttc ccc acg 6672
Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr
2205 2210 2215 2220

ccc gag tac cta cta gag gtc gtg gag agt ctc gtc cg^g att ccg ggc 6720
Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly
2225 2230 2235

gtc aag cgc gtg gtc ttc ggc gac ata cga tct cac gcc acg aac aga 6768
Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg
2240 2245 2250

cat ttt ctt gct gcc agg gcg ctg cat tcg ctg ggc tcc aag g^cg acc 6816
His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr
2255 2260 2265

aaa gat gct ata cgt caa aag atg acg gag atg gaa gag cgc gag gaa 6864
Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu
2270 2275 2280

gag ctg ctc gtc gac ccg gcc ttc ttc acg g^cg ctg ctg cag ggc cag 6912
Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln
2285 2290 2295 2300

ctt gcc gat cga atc aag cac gtc gag atc ctc ccg aag aac atg cgc 6960
Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg
2305 2310 2315

gcc acg aac gag ctg agc g^cg tac cgg tat aca gcc gtc att cac gta 7008
Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val
2320 2325 2330

23/60

cgc ggc cca gag gaa cag tcg cgg ccc gtg tat ccg atc caa gtg aac 7056
Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn

2335

2340

2345

gac tgg atc gac ttt cag gcc tca cgc att gac cgc cgc gcc ctt ctc 7104
Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu

2350

2355

2360

cga ctc cta cag cgc tcg gca gac gcc gcg acc gtc gcc gtc agc aac 7152
Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn
2365 2370 2375 2380

atc ccc tac agc aag acg att gta gaa cgc cat gtc gtc gag tcc ctt 7200
Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu
2385 2390 2395

gac aat aac aac agg gag aat acg cat aga gca cca gac ggc gcg gct 7248
Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala
2400 2405 2410

tgg atc tcg gcc gtc cgc tcc aag gcc gag cgc tgc acg tcc ctc tcc 7296
Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser
2415 2420 2425

gtg acc gat ctt gtg cag ctc ggg gaa gaa gcc ggc ttt cgc gta gaa 7344
Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu
2430 2435 2440

gtc agc gca gca gcg cgg cag tgg tct caa agc ggc gca gtc gat gcc gtc 7392
Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val
2445 2450 2455 2460

ttt cac cgc tat aat ttg ccc act caa agc aat agt cgc gtt ctg att 7440
Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile
2465 2470 2475

cag ttc cct acc gaa gat ggc cag acg cga aga tcc gcc act ctg aca 7488
Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr
2480 2485 2490

aac cga cca cta cag cgt ctg cag agc cgt cgg ttc gca tca cag atc 7536
Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile
2495 2500 2505

cgc gaa cag ctg aag gcc gtg ctc ccg tca tac atg atc ccc tcc cgc 7584
Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg
2510 2515 2520

atc gtg gtc ata gac cag atg cct ctc aat gcc aat ggc aag gtc gac 7632
Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp
2525 2530 2535 2540

cgg aaa gaa ctt acc aga agg gcc caa atc gcg ccg aaa tct cag gcg 7680
Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala
2545 2550 2555

gct ccc gcc aaa ccc gtc aaa cag gtc gat ccg ttc gtc aac ctg gaa 7728
Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu

2560 2565 2570

gcc att tta tgt gag gag ttc gcg gag gtg ctg ggc atg gaa gtc ggc 7776
Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly

2575 2580 2585

gtg aac gac cac ttc ttc caa cta ggc gga cac tct ctc ttg gcc acg 7824
Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr

2590 2595 2600

aag ctc gtc gcg cgt ctc agt cgt cgg cta aac ggt cgt gtg tct gtg 7872
Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val
2605 2610 2615 2620

agg gat gtg ttc gac cag cct gtg att tcc gac ctc gca gtc acc ctc 7920
Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu
2625 2630 2635

cgc cag gga ctg acc ttg gaa aac gcc att ccc gca acg ccg gac agc 7968
Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser
2640 2645 2650

ggg tat tgg gag cag aca atg tcc gca ccg aca acc ccg agc gac gac 8016
Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp
2655 2660 2665

atg gag gcc gtg cta tgc aag gag ttt gcg gat gtg ctt ggc gtc gaa 8064
Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu
2670 2675 2680

gtc agc gcc acc gac agc ttc ttc gat ctc ggt ggg cat tcc ctc atg 8112
Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met
2685 2690 2695 2700

gct acg aag ctc gct gcg cgt att agc cgt cggt cta gat gta ccg gtg 8160
Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val
2705 2710 2715

tca atc aaa gac ata ttc gat cac tca gtt cct cta aac ctt gcg agg 8208
Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg
2720 2725 2730

aag att cggt ctc act caa gca aaa ggc cac gaa gcg acc aat gga gta 8256
Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val
2735 2740 2745

caa atc gcc aac gac gcc cca ttc caa ctc att tcc gta gaa gat cca 8304
Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro
2750 2755 2760

gag ata ttc gtc caa cgt gaa atc gcc cct caa cta caa tgc tca ccc 8352
Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro
2765 2770 2775 2780

gag aca atc cta gac gtc tac ccc gcc acg caa atg caa agg gtc ttc 8400
Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe

2785 2790 2795

ctc ctc aac cca gta aca gga aag ccg cgc tca cca acg cca ttt cac 8448
Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His

2800 2805 2810

ata gac ttc ccg ccg gac gca gac tgc gcc agc ctg atg cgg gca tgt 8496
Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys

2815 2820 2825

gca tct cta gcg aag cat ttc gat atc ttc agg acg gtg ttc ctc gaa 8544
Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu

2830 2835 2840

gcc aga ggc gaa ctc tac caa gta gtt cta aaa cac gtc gac gtg ccc 8592
Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro

2845 2850 2855 2860

atc gag atg ctc cag acc gaa gaa aac atc aac agc gcg acc cgg tcg 8640
Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser

2865 2870 2875

ttc ctg gac gta gac gca gaa aaa ccc atc cgg cta ggc cag cca ctg 8688
Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu

2880 2885 2890

atc cgc atc gcg ata cta gag aag ccc ggg tcc acg ctg cgc gtc atc- 8736
Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile

2895 2900 2905

cta cga tta tcc cac gcc tta tac gac ggc ctg agc cta gag cac atc 8784
Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile

2910 2915 2920

ctg cac tct ctg cac atc ctc ttt ttc ggc ggc agt ctt ccc ccg ccg 8832
Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro
2925 2930 2935 2940

ccc aag ttc gcc ggg tac atg caa cac gtc gcg agc agt cgc aga gaa 8880
Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu
2945 2950 2955

ggc tac gat ttc tgg cgt tcc gtt ctc cga gat tcg tct atg aca gtc 8928
Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val
2960 2965 2970

atc aaa ggc aac aat aat aca act cca cca cct cct cct caa caa caa 8976
Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
2975 2980 2985

tcc acc ccc tcc gga gcc cac cac gcc tcc aaa gta gtc act atc cca 9024
Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro
2990 2995 3000

acc caa gcc aac aca gac agc cg_g atc acg cg_c gcc acg atc ttc act 9072
Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr
3005 3010 3015 3020

acc gct tgc gca cta atg ctc gc_g aaa gaa gac aac tcc agc gac gtc 9120
Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val
3025 3030 3035

gtc ttc ggg cgt acg gta tc_g ggg cgt caa ggc ctg ccc cta gcc cac 9168
Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His
3040 3045 3050

caa aac gt_g atc gga cca tgt ctc aac caa gt_g ccc gt_g cg_c gc_g cg_c 9216
Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg
3055 3060 3065

ggt tta aac cg_a gga acc act cac cac cg_a gaa ct_t ctc cg_c gag at_g 9264
Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met
3070 3075 3080

caa gag caa tat ctc aac agt ctc gct ttc gaa act ctc ggg tac gac 9312
Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp
3085 3090 3095 3100

gag atc aag gc_g cac tgc aca gac tgg cc_g gac gt_g cca gc_g acc gc_g 9360
Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala
3105 3110 3115

agc ttc ggg tgc tgc atc gtg tac cag aac ttc gat tcg cac ccg gac 9408
Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp

3120 3125 3130

agc cga gtc gaa gag cag cgg ctg cag atc ggg gtc ttg tcg cgg aac 9456
Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn
3135 3140 3145

tac gag gct att aat gag ggg ctc gtg cat gat ctt gtt att gct ggg 9504
Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly
3150 3155 3160

gag tcg gag cct gat ggg gat gat ttg agg gtt act gtt gtg gcg aat 9552
Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn
3165 3170 3175 3180

cgg agg ttg tgc gat gag gaa agg ttg aag agg atg ctg gag gag ctg 9600
Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu
3185 3190 3195

tgt ggg aat att cgg gct ttg gcg ttg gtt tag 9633
Cys Gly Asn Ile Arg Ala Leu Ala Leu Val
3200 3205

<210> 2

<211> 3210

<212> PRT

<213> Mycelia sterilia

<400> 2

Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala

1

5

10

15

Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser

20

25

30

Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp

35

40

45

Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile

50

55

60

Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr

65

70

75

80

Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys

85

90

95

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser

100

105

110

Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro

115

120

125

Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp

130

135

140

Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val
145 150 155 160

Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser
165 170 175

His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val
180 185 190

Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp
195 200 205

Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp
210 215 220

Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro
225 230 235 240

Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg
245 250 255

Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu
260 265 270

Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu
275 280 285

Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala
290 295 300

Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val
305 310 315 320

Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly
325 330 335

Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly
340 345 350

Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp
355 360 365

Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser
370 375 380

Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln
385 390 395 400

Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val
405 410 415

Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu
420 425 430

Ile Gln Gln Phe His His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu
435 440 445

Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser
450 455 460

Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys
465 470 475 480

Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly
485 490 495

Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val
500 505 510

Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu
515 520 525

Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu
530 535 540

Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala
545 550 555 560

Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr
565 570 575

Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile
580 585 590

Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg
595 600 605

Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr

610

615

620

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly

625

630

635

640

Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu

645

650

655

His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu

660

665

670

Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro

675

680

685

Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala

690

695

700

Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln

705

710

715

720

Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro

725

730

735

Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu

740

745

750

Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu
755 760 765

Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly
770 775 780

Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro
785 790 795 800

Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg
805 810 815

Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala
820 825 830

Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe
835 840 845

Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val
850 855 860

Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val
865 870 875 880

Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp
885 890 895

Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser
900 905 910

Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly

915 920 925

Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly

930 935 940

Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His

945 950 955 960

Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala

965 970 975

Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu

980 985 990

Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His

995 1000 1005

Asp Ala Pro Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe

1010 1015 1020

Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe

1025 1030 1035 1040

Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met

1045 1050 1055

Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn

1060 1065 1070

Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro
1075 1080 1085

Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser
1090 1095 1100

Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala
105 1110 1115 1120

Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His
1125 1130 1135

Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu
1140 1145 1150

Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val
1155 1160 1165

Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly
1170 1175 1180

Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr
185 1190 1195 1200

Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg
1205 1210 1215

Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile

1220

1225

1230

Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe

1235

1240

1245

Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp Pro Leu Ser Val Val Ser Pro

1250

1255

1260

Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu

265

1270

1275

1280

Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu

1285

1290

1295

Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn

1300

1305

1310

Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu

1315

1320

1325

Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro

1330

1335

1340

Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr

345

1350

1355

1360

Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg

1365

1370

1375

Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met

1380

1385

1390

Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln

1395

1400

1405

Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe

1410

1415

1420

Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg

425

1430

1435

1440

Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu

1445

1450

1455

Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys

1460

1465

1470

Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly

1475

1480

1485

Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu

1490

1495

1500

Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly

505

1510

1515

1520

Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly

1525

1530

1535

Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu

1540

1545

1550

Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala

1555

1560

1565

Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr

1570

1575

1580

Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly

585

1590

1595

1600

Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg

1605

1610

1615

Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu

1620

1625

1630

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr

1635

1640

1645

Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn

1650

1655

1660

Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile

665

1670

1675

1680

Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly
1685 1690 1695

His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu
1700 1705 1710

Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala
1715 1720 1725

Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly
1730 1735 1740

His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser
745 1750 1755 1760

Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys
1765 1770 1775

Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys
1780 1785 1790

Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His
1795 1800 1805

Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala
1810 1815 1820

Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu
825 1830 1835 1840

Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala
1845 1850 1855

Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro
1860 1865 1870

Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu
1875 1880 1885

Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val
1890 1895 1900

Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr
905 1910 1915 1920

Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys
1925 1930 1935

Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu
1940 1945 1950

Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu
1955 1960 1965

Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln
1970 1975 1980

Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg
985 1990 1995 2000

Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met
2005 2010 2015

Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val
2020 2025 2030

Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val
2035 2040 2045

Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala
2050 2055 2060

Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Ala Asp Asp Gln Val
065 2070 2075 2080

Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp
2085 2090 2095

Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser
2100 2105 2110

Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu
2115 2120 2125

Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val

2130

2135

2140

Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala

145

2150

2155

2160

Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr

2165

2170

2175

Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala

2180

2185

2190

Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu

2195

2200

2205

Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

2210

2215

2220

Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly

2225

2230

2235

2240

Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg

2245

2250

2255

His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr

2260

2265

2270

Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu

2275

2280

2285

Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln
2290 2295 2300

Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg
305 2310 2315 2320

Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val
2325 2330 2335

Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn
2340 2345 2350

Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu
2355 2360 2365

Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn
2370 2375 2380

Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu
385 2390 2395 2400

Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala
2405 2410 2415

Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser
2420 2425 2430

Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu

2435

2440

2445

Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val

2450

2455

2460

Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile

465

2470

2475

2480

Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr

2485

2490

2495

Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile

2500

2505

2510

Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg

2515

2520

2525

Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp

2530

2535

2540

Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala

545

2550

2555

2560

Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu

2565

2570

2575

Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly

2580

2585

2590

Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr

2595

2600

2605

Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val

2610

2615

2620

Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu

625

2630

2635

2640

Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser

2645

2650

2655

Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp

2660

2665

2670

Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu

2675

2680

2685

Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met

2690

2695

2700

Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val

705

2710

2715

2720

Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg

2725

2730

2735

Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val -

2740 2745 2750

Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro

2755 2760 2765

Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro

2770 2775 2780

Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe

785 2790 2795 2800

Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His

2805 2810 2815

Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys

2820 2825 2830

Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu

2835 2840 2845

Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro

2850 2855 2860

Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser

865 2870 2875 2880

Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu

2885 2890 2895

Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile
2900 2905 2910

Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile
2915 2920 2925

Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro
2930 2935 2940

Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu
945 2950 2955 2960

Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val
2965 2970 2975

Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln
2980 2985 2990

Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro
2995 3000 3005

Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr
3010 3015 3020

Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val
025 3030 3035 3040

51/60

Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His

3045 3050 3055

Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg

3060 3065 3070

Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met

3075 3080 3085

Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp

3090 3095 3100

Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala

105 3110 3115 3120

Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp

3125 3130 3135

Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn

3140 3145 3150

Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly

3155 3160 3165

Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn

3170 3175 3180

Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu

185 3190 3195 3200

Cys Gly Asn Ile Arg Ala Ala Leu Val

3205

3210

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:concensus sequence

<400> 3

Trp Thr Ser Met Tyr Asp Gly

1

5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:concensus sequence

<400> 4

Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

1

5

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 5

tggacnwsna tgtaygaygg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 6

gtnggraart aytgnacnac

20

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 7

gcggaattaa ccctcaactaa agggaacgaa

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 8

gcgttaatacg actcactata gggcgaagaa

30

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 9

agcatcgat cctaacaatg ggcgttgagc agcaagccct a 41

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 10

tttgcttcgt actcggtcc t 21

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 11

agcatcgat cctaaacaatg tcaaacatgg caccactccc ta

42

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 12

gcatcgat actagagaag

20

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 13

agcatcgat tcggatccct aaaccaacgc caaagccccga at

42

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 14

ctcaaaccag gaactcttc

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 15

gacatgtgga aaccacattt tg

22

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 16

ggggaattcg tgggtggta tatcatggc

29

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 17

gggggatcct tcatgggttt tggg

24

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 18

ggggatcct aaactccat ctatagc

27

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 19

gggtctagac gactcattgc agtgagtgg

29

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp 1 gene promoter

<400> 20

tgatatgctg gagcttccct

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for cyclic depsipeptide synthetase gene

<400> 21

gcacaacctc tttccaggct

20